

氏 名	たかやま みお 高山 みお
学 位 の 種 類	博士（医学）
報 告 番 号	甲第 1657 号
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 21 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）
学 位 論 文 題 目	Quantification of immunohistochemical findings of neurofibrillary tangles and senile plaques for a diagnosis of dementia in forensic autopsy cases （法医解剖症例における認知症診断のための神経原線維変化と老人斑の免疫組織化学的所見の定量化）
論 文 審 査 委 員	（主 査） 福岡大学 教授 久保 真一 （副 査） 福岡大学 教授 坪井 義夫 福岡大学 教授 竹下 盛重 福岡大学 准教授 尾籠 晃司

内 容 の 要 旨

【目 的】

高齢社会となり、法医解剖の現場において、直接死因だけでなく、その背景に認知症が疑われる症例が増えてきている。しかし、病歴が明らかである症例ばかりでなく、生前の病態が不明な症例も少なくない。

申請者は、病理所見からの認知症の診断基準を作成することを目的として、免疫組織化学的に老人斑（SP）と神経原線維変化（NFT）を染色し、その病理所見の画像イメージを、画像解析ソフトを用いて定量化を試みた。

【対象と方法】

1. 症例

2008 年から 2015 年の間に、福岡大学で実施した法医解剖 512 症例のうち、①65 歳以上で、②頭部外傷、熱傷、熱中症を除き、③死因となる頭蓋内病変を認めない、④死後経過時間 48 時間以内の 4 項目全て満たす 48 例を対象とした。このうち、生前に認知症と診断されていた症例 10 例を認知症群（D 群）とし、それ以外の症例 38 例を非認知症群（non-D 群）とした。

2. 観察部位

①中前頭回（MFG）、②上中側頭回（SMTG）、③アンモン角（AH）、④海馬傍回（PHG）、⑤下頭頂小葉（IPL）、⑥中脳（MB）の 6 カ所を観察した。

3. 神経病理学的所見

対象とする神経病理学的所見は、①SP、②NFT、③アミロイド小体 (AB)、④アミロイド血管障害 (AA)、⑤顆粒空胞変性 (GVD)、⑥リポフスチン沈着 (LD)、⑦神経細胞質内封入体 (NIB) の7項目を観察した。

4. 染色方法

組織化学的染色として、①Hematoxylin-eosin 染色、②Luxol fast blue 染色、③Congo red 染色、④Bielschowsky-Hirano 銀染色の4種類を行った。

免疫組織化学的染色は、タウ、 β -アミロイド、ゲフィリン、インターロイキン 33 に対する抗体を用いて染色した。

5. 病理所見の定量化

病理所見は、画像を取得し、そのデータを面積や色調等のパラメーターを用いて処理し、総個数、総面積、一個当たりの面積を計測し、定量化した。

6. 統計処理

D 群、non-D 群間を、Student t 検定で群間比較を行い、有意差が認められた項目について ROC 曲線より、カットオフ値を求めた。

【結 果】

観察部位については、神経病理学的所見の出現頻度等から、中脳を除く5カ所とした。神経病理学的所見を各種組織化学的染色で観察した結果、NFT と SP が、頻度と特異性から認知症診断に有効と考えられた。免疫

組織化学的に4種類の抗体で染色し、特異性やコントラストを検討した結果、タウ陽性 NFT と β -アミロイド陽性 SP の染色像が良好であった。そこで、これらの画像データを取得し、数や面積を計測し、統計処理を行った。その結果、PHG における NFT の総個数、SMTG における SP の総個数、総面積、一個当たりの面積、AH における SP の総個数、PHG における SP の総面積において有意差 ($p < 0.01$) が認められた。さらに、AH における NFT の総個数、PHG における SP の総個数でも有意差 ($p < 0.0001$) が認められた。有意差が認められた項目についてカットオフ値を求めた。

【結 論】

有意差 ($p < 0.0001$) を認めた AH における NFT の総個数、PHG における SP の総個数についてカットオフ値を診断基準とした場合、1) 海馬回でタウ陽性 NFT が約 6mm^2 中 41 個以上、または 2) 海馬傍回で β -アミロイド陽性 SP が約 5mm^2 中に 47 個以上ある場合、認知症と診断可能と考えられる。

免疫組織化学的にタウ陽性 NFT と β -アミロイド陽性 SP の画像データを取得し、画像分析ソフトで、病理所見の数や面積を定量化することで生前の認知症の診断を可能にできるものとする。

審査の結果の要旨

法医剖検診断においては、直接死因ばかりでなく、死に至る経過、背景の解明も重要である。高齢社会となり、法医学解剖においても、高齢者の剖検例は増加している。これらの症例では、背景にある認知症の診断が重要である。しかし、剖検脳の神経病理学的検索において、生理的加齢変化と病的変化、認知症の判断に苦慮することは少なくない。

本論文は、免疫組織化学的に染色した老人斑 (SP) と神経原線維変化 (NFT) を定量化し、認知症の診断基準の作成を試みたものである。Tau陽性NFTと β -Amyloid陽性SPを対象として、画像データを取得し、数や面積を計測し、統計処理を行った。その結果、 $p < 0.01$ の項目は、海馬傍回におけるNFTの総個数、上中側頭回におけるSPの総個数・総面積・一個当たりの面積、海馬回におけるSPの総個数、海馬傍回におけるSPの総面積であった。 $p < 0.0001$ の項目は、海馬回におけるNFTの総個数、海馬傍回におけるSPの総個数であった。さらに、これらの項目のカットオフ値から、診断基準に $p < 0.0001$ であった項目を採用した場合、NFTの数が、海馬回で約6 mm²中41個以上、または海馬傍回で約5 mm²中に47個以上認めたときは、認知症が疑われることが明らかとなった。

免疫組織化学的に Tau 陽性 NFT と β -Amyloid 陽性 SP の画像データを取得し、画像解析ソフトで、病理所見の数や面積を定量化することで生前の認知症の診断を可能にできるものとする。

1. 斬新さ

本研究は、認知症の剖検診断において、従来の組織化学的染色に加え、免疫組織化学的染色を行い、画像データから病理所見を定量化する診断方法に取り組んだものであり挑戦的である。また、認知症の剖検診断の基準を示した点において斬新である。

2. 重要性

高齢者の剖検例では、死因のみならず、生前の認知症の有無を明らかにすることは、事件、事故の解明に欠かせないものであり、その点において、本研究は極めて重要である。

3. 研究方法の正確性

本研究では、免疫組織化学的染色の定量化が重要である。各抗原の免疫反応性に基づき、標的抗原と神経病理学的所見を選別し、取得した画像を、解析ソフトで、個数、面積を定量化している。研究方法是正確なものとして判断した。

4. 表現の明瞭性

定量化された病理変化は、統計学的に適切に解析したうえで、その結果は、表やグラフで示されており、表現は明瞭かつ解りやすいものとなっている。

5. 主な質疑応答

- Q1 Tau、 β -Amyloid に加えて、なぜ Gephyrin、IL-33 を用いたのですか。
- A1 最近の研究より、NFT、SP の新たな免疫抗原として Gephyrin、IL-33 を採用してみました。しかし、従来から使用されている、Tau、 β -Amyloid による染色のほうが特異性等に優れていました。
- Q2 症例の 2 群間において年齢に有意差がありますが、年齢による影響はないのですか。
- A2 今回、80 歳以上の症例に絞って統計処理を行い、検討した結果、SP の総個数、NFT の総個数について有意差を認めました。従って、年齢における有意差は考慮しなくてもよいと考えます。
- Q3 Tau、 β -Amyloid のどの陽性領域を病変として取得するか、しないかの判断や、画像処理の操作は難しいのですか。
- A3 病理所見の大きさ、形、核の有無などから判断が困難な病変もあり、個々の病変をみながら、病変の取得を行いました。
- Q4 診断基準 A、B はどのように利用していこうと考えていますか。
- A4 より多くの診断項目を満たした場合、より認知症の可能性が高くなるものと考えます。
- Q5 核を持たない NFT の方が、重症度が高いといわれていますが、今回は、どうして核をもつ NFT を対象としたのですか。
- A5 連続切片で染色している関係で、核を持つ NFT と核を持たない NFT を重複して計測する可能性があったので、今回は、核を持つ NFT のみとしました。
- Q6 病理学的に Alzheimer 病と診断するには、Braak の分類の Stage V、VI をみるため、海馬を超えた広がりを見なければならぬのではないですか。
- A6 今回の症例は、皮質で NFT を認めた症例が少なかったため、NFT の観察部位として、海馬回・海馬傍回のみとしました。
- Q7 認知症の原因となる他の疾患が症例に含まれているのではないですか。
- A7 少なくとも、病理学的に血管性認知症を疑うものではありませんでした。Lewy 小体型認知症に関しては、Synuclein を確認していないため、含まれていた可能性は否定できないと思います。
- Q8 染色がうすく、広がりのある SP を所見としてとらなかったのはなぜですか。その所見を拾うと有意差はどのようにになりますか。

A8 画像解析の上で、隣接する SP と一緒に計測され、個数が減ったり、面積が大きく計測されるため除外しました。

本論文は、法医剖検脳を免疫組織化学的に染色した Tau 陽性 NFT と β -Amyloid 陽性 SP の画像データを定量化し、統計学的に解析したものである。認知症の剖検診断のための診断方法とその基準を提案したものであり、学位論文に値すると評価された。